



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 40 119 A 1**

⑤① Int. Cl.⁵:
C 07 K 15/06
C 07 K 3/14
C 07 K 3/20

②① Aktenzeichen: P 42 40 119.4
②② Anmeldetag: 30. 11. 92
④③ Offenlegungstag: 1. 6. 94

DE 42 40 119 A 1

⑦① Anmelder:

Jennissen, Herbert, Prof. Dr., 4300 Essen, DE;
Demiroglou, Anastasios, Dr., 4300 Essen, DE

⑦② Erfinder:

gleich Anmelder

⑥④ Verfahren zur Gewinnung von molekular einheitlichem, nativem, biologisch vollaktivem Fibrinogen aus Blut

DE 42 40 119 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 04. 94 408 022/259

7/45

WEST

Fibrinogen ist ein Eiweißbestandteil des Blutplasmas. Es dient dem Wirbeltierorganismus in der Hämostase, d. h. der Blutstillung, durch Blutgerinnung mit anschließender Retraktion des Gerinnsels und der damit verbundenen Verkleinerung der Wundfläche. Eine Entgleisung der Blutgerinnung z. B. durch Fibrinogenmangel kann zu unstillbaren Blutungen, hohem Blutverlust und Tod führen.

Unerwünschte Funktionen des Fibrinogens treten in Form von Thrombose- und Thromboembolieerscheinungen bei der Arteriosklerose oder biologischer Inkompatibilität implantierter Biomaterialien auf. Neben einer gesteigerten Entstehung von Thromben kann auch eine mangelhafte Fibrinolyse zur Thromboseneigung führen. Daher gehört der Gerinnungstest zur empfindlichsten Funktionsprüfung des Fibrinogens.

Fibrinogene bestehen aus 2×3 verschiedenen Untereinheiten ($\text{A}\alpha \text{B}\beta \gamma$)₂ die über Disulfidbrücken miteinander zu einem Monomer verbunden sind. Bei der Blutgerinnung findet durch Thrombin eine limitierte Proteolyse des Fibrinogens statt, bei der die Fibrinopeptide A und B abgespalten werden. Dadurch wird das Fibrinogen zum Fibrin. Die Fibrinmoleküle aggregieren zum Fibringerinnsel, das durch Faktor 13 quervernetzt und retrahierfähig wird.

Fibrinogen ist bei physiologischer Salzkonzentration ein empfindliches Protein von bei 0–40°C nur beschränkter Haltbarkeit und von einer von den Bedingungen abhängigen nativen Struktur. Spuren von Proteasen, SH-Reagentien und der Einfluß verschiedenster chemischer Stoffe oder auch unphysiologische Bedingungen führen zu einer Veränderung der dreidimensionalen Proteinstruktur (Denaturierung) und zu einem Verlust an biologischer Funktion.

Bisher konnte Fibrinogen aus Blutplasma mit Ausbeuten von 10–20% nur in sehr aufwendigen, 5–7 Schritte umfassenden Verfahren [Blombäck, B. und Blombäck, M. Ark. Kemi 10, 415–443 (1956); Mahn, I. und Müller-Berghaus, Hämostasis 4, 40–50 (1975)] hergestellt werden. Hierfür wurden beispielsweise die verschiedenen Plasmaproteine fraktioniert gefällt. Insbesondere jedoch das Rinderfibrinogen kann auf diesem Wege bis heute nicht in seiner nativen Form erhalten werden. Diese bekannten Verfahren der Fraktionierung und Aufarbeitung durch Fällungsmethoden erschweren die Gewinnung großer Mengen nativen Fibrinogens und sind deswegen wenig dafür geeignet, da durch ihre Handhabung, insbesondere durch die z. T. drastischen Fällungsmethoden das Fibrinogen der möglichen Denaturierung und Proteolyse ausgesetzt ist. Auch die lange Zeit der Präparation erhöht diese Gefahr sehr. Ferner ist es schwierig, die dabei anfallenden Blutfraktionen zur Isolierung anderer Plasmaproteine weiter zu verwenden. Auch andere Methoden zur Abtrennung von Fibrinogen aus Blut mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie oder Elektrophorese wurden erprobt, doch eine Reinigung des Fibrinogens gelang nur im Zusammenwirken mit zusätzlichen Reinigungsschritten.

Alle diese Reinigungsverfahren ermöglichen aus verschiedensten Gründen die Aufarbeitung von Fibrinogen aus Plasma nur unter großem Zeitaufwand, mit großem Abfall und der Gefahr, daß strukturell und funktionell verändertes Fibrinogen isoliert wird. Ferner fallen neben Handhabungsschwierigkeiten unverhältnismäßig hohe Kosten durch die benötigten großen Mengen beispielsweise an Glycin und Äthanol für Fällungsschritte

an.

Für die Erforschung der biologischen Funktionen des Fibrinogens, für die medizinisch-diagnostischen sowie medizinisch-technischen Anwendungen und insbesondere für therapeutische Verfahren am Patienten ist die Verfügbarkeit von molekular einheitlichem, nativem, biologisch vollaktivem Fibrinogen eine entscheidende Voraussetzung. Es besteht deshalb das Bedürfnis nach einem Verfahren, das die rasche, schonende, wirkungsvolle, umweltschonende und wirtschaftliche Gewinnung von Fibrinogenen aus Wirbeltieren für die Human- und Tiermedizin in einem einfachen und technischen Maßstab ermöglicht.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Gewinnung von molekular einheitlichem, nativem, biologisch vollaktivem Fibrinogen aus Blut zur Verfügung zu stellen. In wirtschaftlich vertretbarer Weise wird die rasche und schonende Gewinnung großer Mengen Fibrinogens in hoher Ausbeute in einem Schritt aus Blutplasma ermöglicht. Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Die Erfindung betrifft demnach ein Verfahren zur Gewinnung von molekular einheitlichem, nativem, vollaktivem Fibrinogen aus Blut, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) Blut mit einer ausreichenden Menge gerinnungshemmender Substanz versetzt,
- b) das ungerinnbare Blut bei höchstens durchschnittlich $400 \times g$ und einer Temperatur von etwa 0–37°C etwa 5–20 min zentrifugiert und den Plasmaüberstand von den sedimentierten Zellen abtrennt,
- c) das molekular einheitliche, native Fibrinogen durch einen einzigen hydrophoben Interaktionsschritt abtrennt und isoliert.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden also nach Ungerinnbarmachung des Blutes und der Abtrennung zellulärer Bestandteile aus dem ungeronnenen Plasma in einem einzigen Schritt molekular einheitliches, natives, voll aktives Fibrinogen gewonnen. Dabei entfällt die Notwendigkeit, große Mengen an Fraktionierungsmitteln in hoher Konzentration zusetzen zu müssen, um eine konsekutive Fraktionierung der Plasmaproteine und damit eine Isolierung des Fibrinogens in bis zu sieben Schritten zu ermöglichen. Dadurch, daß keine weiteren Trennmittel zur Auftrennung der Plasmaproteine eingesetzt werden, wird das Verfahren nicht nur erheblich wirtschaftlicher und umweltschonender, sondern es verläuft auch proteinschonender und ermöglicht deshalb die Gewinnung des Fibrinogens in hoher Ausbeute unter Beibehaltung der funktionellen und strukturellen Integrität. Das so isolierte Fibrinogen steht dann sofort für analytische, chemisch technische oder auch medizinisch therapeutische Verfahren zur Verfügung.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Gewinnung von Fibrinogen aus dem Blut der verschiedensten Lebewesen. Wegen der leichten Verfügbarkeit ist die Verwendung von Säugerblut, insbesondere Blut vom Menschen, Affen, Schwein, Rind, Schaf, Pferd, Ziege, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte oder Maus bevorzugt. Bevorzugt wird natives, antikoagulierendes Blutplasma verwendet, obwohl gleichwertige Ergebnisse auch mit tiefgefrorenem antikoaguliertem Blutplasma erzielt werden.

Zur Verhinderung der Koagulierung können dem na-

tiven Blut übliche Antikoagulantien, wie Citrate, Oxalate, EDTA oder Heparin in üblicher Menge zugesetzt werden. Aus wirtschaftlichen Gründen wird als Antikoagulans vorzugsweise eine Citratlösung verwendet. Desweiteren können Proteaseinhibitoren zum Schutz des nativen Fibrinogens zugesetzt werden. Bewährt haben sich ϵ -Aminocapronsäure und Aprotinin in den üblichen Konzentrationen.

In der einzigen Stufe des Verfahrens wird das ungeronnene Plasma zur hydrophoben Interaktion mit einer geeigneten hydrophoben Matrix gebracht. Eine solche Matrix besteht beispielsweise aus einer unlöslichen Phase und daran befindlichen hydrophilen und hydrophoben chemischen Strukturen. Insbesondere eignen sich als Matrix alle festen Phasen mit hydrophilen Oberflächen, die zusätzliche hydrophobe/apolare Gruppen tragen. Spezielle Beispiele für solche Matrices sind Alkyl- oder Aryl-Zellulosen, -Agarosen oder entsprechende mit Kohlenhydraten oder Polyhydroxykohlenstoffketten d. h. hydrophil beschichtete Polymer-, Silika-, Zeolit- oder Aluminiumhydroxidpartikel, die beispielsweise in einem späteren Verfahren entsprechend mit Alkyl- oder Arylgruppen substituiert werden. Auf solchen festen Phasen liegen geeignete Substitutionsgrade mit hydrophoben Gruppen in einem Bereich von $0.02-8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Als hydrophile feste Phase eignet sich zur Substitution mit hydrophoben Gruppen vorzüglich die Agarose als 4%iges, kugelförmiges Gel (Sephacrose® 4B).

Insbesondere eignet sich als hydrophob interagierende Matrix eine Alkylagarose, die mit Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Pentyl- oder Hexylgruppen substituiert wurde bei Substitutionsgraden zwischen $1-100 \mu\text{mol}/\text{ml}$ gepacktes Gel ($0.02-0.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). Alkylkette und Substitutionsgrad werden so gewählt, daß zwischen dem Fibrinogen in frischem Blutplasma, das ca. 150 mM NaCl enthält, und hydrophober Matrix, die mit einer 150 mM NaCl Salzlösung bei pH 7.2–7.5 vorzugsweise bei pH 7.4 äquilibriert ist, gerade keine hydrophobe Interaktion stattfindet. Vorzugsweise wird eine kugelförmige Pentylagarose verwendet. Solche vorzugsweise verwendeten Pentyl-Sephacrosen® besitzen einen Substitutionsgrad von $12-13 \mu\text{mol}/\text{ml}$ gepacktes Gel.

Für die Synthese der Pentylagarose in Form der kugelförmigen Pentyl-Sephacrose® 4B eignen sich mehrere Verfahren, beispielsweise die Kopplung von Pentylamin nach Aktivierung der Agarose mit BrCN [Jennissen, H.P. & Heilmeyer, L.M.G., Biochemistry 14, 454–460 (1975)], Carbonyldiimidazol oder auch Tresylchlorid. Vorzuziehen ist die Methode unter Verwendung von Carbonyldiimidazol nach dem von uns beschriebenen Verfahren mit ^{14}C -markiertem Alkylamin [Demiroglou, A. & Jennissen, H.P., J. Chromatogr. 521, 1–17 (1990)].

Die Pentyl-Sephacrose® wird mit dem ungeronnenen Blut, vorzugsweise mit ungeronnenem Blutplasma in Gegenwart eines Salzes zur hydrophoben Interaktion gebracht. Hierfür eignen sich beispielsweise anorganische Salze, organische Salze oder die Salze von Aminosäuren, die auch innere Salze bilden können. Insbesondere werden anorganische Neutralsalze oder die Salze von Aminosäuren verwendet, vorzugsweise NaCl oder Glycin. Die untere Salzkonzentration liegt zwischen $0-200 \text{ mM}$ und sollte vorzugsweise so gewählt werden, daß eine hydrophobe Interaktion zwischen Plasmafibrinogen und Pentylagarose nicht stattfinden kann. Eine solche vorzugsweise geeignete Endkonzentration liegt für NaCl und Glycin bei 150 mM . Die Erhöhung der Salzkonzentration über die untere Salzkonzentration hinaus bedingt die hydrophobe Interaktion zwischen

Plasmafibrinogen und hydrophober Matrix. Solche höheren Konzentrationen liegen beispielsweise zwischen $0.5-5.0 \text{ M}$. Die Obergrenze der Salzkonzentration wird von der Salzart und der Ausfällung des Fibrinogens durch die Salze bei hohen Konzentrationen bestimmt. Konzentrationen über 2.0 M sind aus diesen Gründen unzuverlässig. Besonders geeignet ist ein Konzentrationsbereich zwischen $0.5-2.0 \text{ M}$, vorzugsweise ein Bereich zwischen $1.1-1.6 \text{ M}$.

Die hydrophobe Interaktion erfolgt bei Temperaturen von $0^\circ-50^\circ\text{C}$ vorzugsweise bei $20-25^\circ\text{C}$ bei einem pH-Wert von $5.0-9.0$, vorzugsweise bei pH 7.2–7.5.

Damit die hydrophobe Interaktion zwischen dem Fibrinogen im Plasma und der hydrophoben Matrix (Adsorption) stattfinden kann, werden das Blutplasma und die hydrophobe Matrix miteinander in Kontakt gebracht. Dies geschieht entweder im Eintopfverfahren oder auf einer Chromatographiesäule. Die Vollständigkeit der Fibrinogenadsorption hängt von dem Verhältnis des Plasmavolumens (ml) zum Volumen der hydrophoben Matrix (ml gepacktes Gel; 1 ml gepacktes Gel entspricht ca. $30-40 \text{ mg}$ Agarosetrockensubstanz) ab. Geeignete Volumenverhältnisse Plasma : Gel liegen zwischen $1:10$ und $10:1$ in Abhängigkeit von Gelmatrix und Salzkonzentration. Das verwendete Verhältnis wird beispielsweise von Reinheitsgrad und Ausbeute des Fibrinogens und von Wirtschaftlichkeitsgesichtspunkten bestimmt. Bewährt hat sich ein Verhältnis zwischen $1:5$ und $1:1$.

Die Gelmatrix mit dem durch hydrophobe Interaktion adsorbierten Fibrinogen wird nun von dem fibrinogenverarmten Restplasma abgetrennt. Anschließend wird die hydrophobe Interaktion durch Erniedrigung der Salzkonzentration so vermindert, so daß das reine Fibrinogen in die lösliche Pufferphase übergeht (Elution) und von der Gelmatrix abgetrennt werden kann.

In einer Ausführungsform, dem Eintopfverfahren, erfolgt die Adsorption des Fibrinogens in einem Gefäß, in dem die Gelsuspension vorsichtig geführt wird. Die Abtrennung der Gelmatrix vom Restplasma erfolgt durch ein Schwerfeld d. h. durch Schwerkraft oder durch Zentrifugation, wobei die Zentrifugation vorzugsweise bei $400 \times g$ für $10-15$ Minuten durchzuführen ist. Nach Beendigung des Zentrifugierens wird der fibrinogenverarmte Plasmaüberstand in üblicher Weise, beispielsweise durch Dekantieren, Abheben oder Abpumpen von der sedimentierten Matrix abgetrennt. Der Überstand kann anderen Zwecken zugeführt werden. Die sedimentierte Gelmatrix kann anschließend im gleichen Verfahren mehrfach — nach Aufnahme in einem dem Gelvolumen gleichen Volumen der Äquilibrierungslösung (Salzlösung) und erneuter Abzentrifugation — gewaschen werden, so daß am Ende der Fibrinogen-Matrixkomplex vollständig von allen nichtadsorbierten Fremdproteinen abgetrennt in reiner Äquilibrierungslösung vorliegt. Durch Aufnahme der Gelmatrix in einer Lösung niedrigerer Salzkonzentration, vorzugsweise im ursprünglichen Suspensionsvolumen, erfolgt die Elution des reinen Fibrinogens in die Flüssigkeitsphase, die im üblichen Verfahren durch Zentrifugation von der Gelmatrix abgetrennt werden kann und das Endprodukt liefert.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das ungeronnene Plasma durch Auftrag auf eine Chromatographiesäule mit der Gelmatrix zur hydrophoben Interaktion gebracht, wobei das fibrinogenverarmte Restplasma und begleitende Fremdproteine in der flüssigen Phase herausgespült werden. Das so abgetrennte Restplasma kann an-

deren Zwecken zugeführt werden. Die Elution des reinen Fibrinogens erfolgt durch den Auftrag einer Lösung niedrigerer Salzkonzentration, beispielsweise mit 0.15 M NaCl, und durch das Auffangen der das Fibrinogen enthaltenden herausfließenden flüssigen Phase. Durch eine weitere Absenkung der Salzkonzentration, beispielsweise auf Null, kann ein zusätzliches Plasmaprotein in reiner Form gewonnen werden. Eine Durchführung des Verfahrens im Litermaßstab oder darüber ist möglich.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Gewinnung von molekular einheitlichem, nativem, biologisch aktivem Fibrinogen in einem Schritt.

Das Beispiel erläutert das Verfahren

Ausführungsbeispiel

A. Gewinnung von molekular einheitlichem nativem, biologisch vollaktivem Fibrinogen in einem Schritt.

20 ml frischen ungeronnenen Blutplasmas, das aus (durch Zusatz von 20 mM Trinatriumcitrat) ungerinnbar gemachtem Humanblut durch Zentrifugation bei 400 × g für 20 Minuten bei Zimmertemperatur gewonnen wurde, werden sofort bei Zimmertemperatur auf eine Chromatographiesäule (1.4 cm Innendurchmesser × 13 cm Höhe) aufgetragen, die 20 ml gepackte kugelförmige Pentylagarose (Pentyl-Sepharose® 4B) mit einem Substitutionsgrad von 13.6 µmol/ml gepacktes Gel enthält. Die Pentylagarosesäule ist äquilibriert mit Puffer A, der 50 mM Tris/HCl, 1.5 M NaCl, 1 mM EGTA bei pH 7.4 enthält. Nach dem Auftrag wird die Säule zur Auswaschung des nicht adsorbierten Fremdproteins mit 200 ml Puffer A gewaschen. Danach wird die Säule mit Puffer B, der 50 mM Tris/HCl, 0.150 M NaCl, 1 mM EGTA bei pH 7.4 enthält, eluiert. Durch die Mischung der beiden Puffer A und B auf der Säule wird ein negativer NaCl-Gradient erzeugt, wobei das reine Fibrinogen in den ersten 50 ml eluiert wird und sofort eingefroren werden kann. Aus 19 ml humanem Blutplasma werden auf diesem Wege etwa 15 mg molekular einheitliches, natives, biologisch vollaktives Fibrinogen gewonnen. Die Ausbeuten des Verfahrens liegen bei 25–60%. Das erfindungsgemäß gewonnene Fibrinogen weist eine Gerinnbarkeit 93–100% auf und besteht in der Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS/DTE aus drei Hauptbanden im Verhältnis von etwa 1 : 1 : 1 mit den folgenden molekularen Massen ± 2% : Humanblut: Aα 72 kDa, Bβ 60 kDa, γ 51 kDa. Im gleichen erfindungsgemäßen Verfahren kann aus Rinderplasma molekular einheitliches, natives, biologisch vollaktives Rinderfibrinogen gewonnen werden, das folgendes Untereinheitenmuster mit den aufgeführten molekularen Massen aufweist: Aα 74 kDa, Bβ 64 kDa, γ 53 kDa. Die verwendete Pentylagarose kann beispielsweise durch 0.1 M NaOH, 7.5 M Harnstoff oder 1% SDS regeneriert werden und mindestens 10mal wiederverwendet werden.

Ein typisches Chromatogramm für die Isolierung von humanem Fibrinogen ist in Abb. 1 dargestellt.

a) In einer anderen Ausführungsform werden dem in (A) erhaltenen ungeronnenen Plasma 2 mM EGTA, 5 mM ε-Aminocapronsäure, 100 U/ml Aprotinin, pH 7.4 zugesetzt. Anschließend wird das Plasma eingefroren, vorzugsweise bei –80°C. Zu einem späteren Zeitpunkt werden 20 ml gefrorenes Blutplasma langsam bei 0°C aufgetaut und, wie

oben beschrieben (A), chromatographiert.

b) In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Pentylagarosesäule mit Puffer C, der 50 mM Tris/HCl, 1.5 M Glycin, 1 mM EGTA bei pH 7.4 enthält, äquilibriert. Nach Auftrag des ungeronnenen Plasmas und Waschen mit Puffer C wird mit Puffer D, der 50 mM Tris/HCl, 0.150 M Glycin, 1 mM EGTA bei pH 7.4 enthält, eluiert.

c) In einer weiteren Ausführungsform wird dem Blutplasma vor der Auftragung auf die Chromatographiesäule festes NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1.5 M zugesetzt. Der weitere Verlauf des Verfahrens ist wie in (A).

d) In einer weiteren Ausführungsform wird dem ungeronnenen Blutplasma vor der Auftragung auf die Chromatographiesäule festes Glycin unter pH-Konstanz bis zu einer Endkonzentration von 1.5 M zugesetzt. Nach Auftrag wird mit Puffer C gewaschen und mit Puffer D, der 50 mM Tris/HCl, 0.150 M Glycin, 1 mM EGTA bei pH 7.4 enthält, eluiert.

Abb. 1

Gewinnung von molekular einheitlichem, nativem, biologisch voll aktivem Fibrinogen aus humanem Blutplasma in einem Schritt.

19 ml frischen ungeronnenen humanen Blutplasmas werden auf 20 ml gepackte Pentyl-Sepharose® 4B (Substitutionsgrad: 13.6 µmol/ml gepacktes Gel) in einer Chromatographiesäule (1.4 cm Innendurchmesser × 13 cm Höhe) aufgetragen (Pfeil 1), die mit Puffer A (50 mM Tris/HCl, 1.5 M NaCl, 1 mM EGTA, pH 7.4) äquilibriert ist. Die Durchflußrate beträgt 70 ml/Stunde, das Fraktionsvolumen 6 ml. Die nichtadsorbierten Fremdproteine werden mit 200 ml Puffer A herausgewaschen. Die Elution (Pfeil 2) erfolgt mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, 0.150 M NaCl, 1 mM EGTA, pH 7.4). In den Fraktionen 30–32 befindet sich reines Fibrinogen mit einer Gerinnbarkeit von 93–100% (B) in einer Ausbeute von 25%.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von molekular einheitlichem, nativem, biologisch vollaktivem Fibrinogen aus Blut, gekennzeichnet dadurch, daß man

- a) Blut ungerinnbar macht
- b) aus dem Blut in einem einzigen Schritt das molekular einheitliche, native, biologisch vollaktive Fibrinogen abtrennt und isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem in Stufe

- a) erhaltenen nicht geronnenen Blut
- c) die Zellen insgesamt abtrennt
- d) die Zellen fraktioniert nach Zelltyp separat abtrennt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß man

- e) zur Zellabtrennung Zentrifugation verwendet, insbes., den Plasmaüberstand dadurch erhält, daß man bei höchstens durchschnittlich 400 × g und einer Temperatur von 0–37°C etwa 5–20 min zentrifugiert und den ungeronnenen Plasmaüberstand von den Zellen abtrennt,
- f) daß man zur Zellabtrennung nach einem anderen literaturbekannten Verfahren vorgeht,

- beispielsweise nach dem chromatographischen Verfahren von Shaltiel [Halperin G., Shaltiel S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1497—1503 (1976)] oder nach dem Aggregationsverfahren von Wissler [Wissler, J.H., 5 US Patent 4,343,793 (1982)].
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem in Stufe c) erhaltenem ungeronnenem Plasmaüberstand
- g) das native, molekular einheitliche, vollaktive 10 Fibrinogen durch einen einzigen, hydrophoben Interaktionsschritt — durch Verteilung zwischen einer stationären, unlöslichen Phase ("Matrix") und einer mobilen löslichen Phase ("Lösung") abtrennt und isoliert. 15
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Chromatographie- oder Eintopf-("Batch-") verfahren zur hydrophoben Interaktion anwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man für die hydrophobe Interaktion 20 als stationäre unlösliche Phase eine Matrix verwendet, auf der um daran befindlichen polaren und insbesondere apolaren Gruppen eine geordnete Wasserstruktur entsteht, dadurch daß sie beispielsweise in einem Cluster von 4fach koordiniertem Wasser im Gleichgewicht mit reinen, monomeren Wassermolekülen entropisch geordnete 5fach koordinierte Wasseranordnungen bilden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix aus einer geordneten 30 Kombination von hydrophilen und hydrophoben Strukturbausteinen besteht.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Strukturbausteine 35 der Matrix, beispielsweise aus Hydroxylgruppen enthaltenden Polymeren, insbesondere Zellulose oder Agarose, vorzugsweise aus kugelförmiger Agarose und die hydrophoben Strukturbausteine aus Kohlenwasserstoffverbindungen bestehen. 40
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophoben Strukturbausteine der Matrix beispielsweise aus Alkyl- oder Arylgruppen, insbesondere linearen Alkylresten mit einer Kettenlänge von 1—18 Kohlenstoffatomen 45 vorzugsweise Pentylgruppen besteht.
10. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als mobile Phase eine hydrophile Lösung verwendet, insbesondere eine ionische Lösung. 50
11. Verfahren nach Anspruch 5 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß Fibrinogen von anderen Molekülen insbesondere von anderen Proteinen abgetrennt wird, beispielsweise um deren Eigenschaften zu verbessern oder deren Wirkungen und Verträglichkeiten zu erhöhen. 55

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

60

65

